

УДК 616.831-005.4:577.15-019  
 © Куровська В.О., Ткачук С.С., Тимофійчук І.Р., 2009

## АКТИВНІСТЬ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГІДРОГЕНАЗИ ЗА УМОВ ІШЕМІЇ-РЕПЕРFUZІЇ: ВПЛИВ NO-ЗАЛЕЖНИХ МЕХАНІЗМІВ

Куровська В.О., Ткачук С.С., Тимофійчук І.Р.

Буковинський державний медичний університет

**Вступ.** Окисний стрес вважають однією з основних патогенетичних ланок ушкодження нервової тканини за умов ішемії-реперфузії. Відомо, що оксид азоту (NO) у цьому процесі може мати як позитивні так і негативні впливи. Розкриття цих механізмів можуть допомогти дослідження останніх років, які встановили взаємозв'язок між продукуванням NO і активністю глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ) – головного ферменту пентозофосфатного шляху. Так, було відмічено, що посилення активності Г-6-ФДГ є одним з чинників, коли клітини можуть бути захищені від наростаючого окисного стресу і підтримувати рівень біоактивності NO таким чином, щоб запобігти дисфункції. Експресія Г-6-ФДГ пов'язана зі зменшенням внутрішньоклітинних активних форм кисню та продуктів перекисного окиснення ліпідів [7]. У подібних дослідженнях підсумовується, що за різних умов активність Г-6-ФДГ швидко бере верх у відповіді на окисний стрес, шляхом підтримання глутатіону у відновленій формі [8]. Адапція Г-6-ФДГ – це головне джерело клітинного НАДФН. Останній необхідний не тільки для метаболізму глутатіону, але й слугує необхідним кофактором для всіх ізоформ синтази оксиду азоту. Є дані, що концентрація позаклітинної глюкози регулює експресію гену iNOS і продукування NO через Г-6-ФДГ-залежний механізм [10]. Уведення амінокислоти L-аргініну – донора NO, в умовах необхідності напруження функцій сприяє зменшенню рівня глюкози в плазмі крові [9].

Про активність NO-синтаз частіше роблять висновок за концентрацією в біологічних рідинах стабільних метаболітів NO – нітратів і нітритів. Одні дослідження вказують на достовірне підвищення рівня останніх у відповідь на введення L-аргініну [2], інші, на їх зниження [4]. Вважають, за умов ішемії є два піки підвищення концентрації NO: перший у перші 5-20 хв після ішемії, другий – через 12-24 год. Такі процеси пов'язують з активністю різних ізоформ NO-синтаз: напочатку – конститутивних, а надалі – кальційнезалежних.

**Таблиця.** Взаємозалежність між активністю Г-6-ФДГ та рівнем NOx в полях гіпокампа шурів за умов ішемії-реперфузії головного мозку та введення L-аргініну, (M±m; n=10)

Групи спостереження	Активність ферменту глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (нмоль/г.мг)			Показники рівня Nox (мкг/мг тканини)		
	CA1	CA2	CA3	CA1	CA2	CA3
контроль	0,34 ±0,01	0,31±0,01	0,34±0,011	7,32 ±0,32	7,32 ±0,36	7,30 ±0,36
20хв ішемія	0,56±0,009 ***	0,44 ±0,01 *	0,49±0,014*	10,98 ±0,44 **	10,36 ±0,5 **	10,25 ±0,7 **
1год реперфузії	0,45±0,012 **	0,39±0,015	0,41±0,016	9,56 ±0,98	9,23 ±0,67 *	9,44±0,76 *
24год реперфузії	0,46±0,014**	0,37 ±0,01	0,42±0,015	10,72 ±0,53 **	10,38±0,63 **	10,12±0,49 **
L-аргінін	0,37 ±0,018	0,34±0,009	0,35 ±0,011	8,73 ±0,21	7,35 ±0,29	7,36±0,49
L-аргінін 20хв ішемія	0,58±0,016	0,46±0,012 *	0,49±0,015 *	12,56±0,12 ***	11,74 ±0,4 ***	11,69±1,03 *
L-аргінін 1год реперфузії	0,62±0,008 ***	0,50±0,008 **	0,58±0,007 **	13,24±0,25 **	12,01 ±0,34 ***	12,38±0,791 *
L-аргінін 24год реперфузії	0,64±0,009 ***	0,51±0,009 **	0,59 ±0,009 **	15,86±0,34 ***	14,23±0,24 ***	14,78±0,65 **

**Примітка:** статистично достовірні різниці у порівнянні з контрольною групою: \* – p<0,05, \*\* – p<0,025, \*\*\* – p<0,005.

Ішемія впродовж 20 хв спричиняє зростання активності Г-6-ФДГ в усіх полях гіпокампа: CA<sub>1</sub> в 1,64 раза, CA<sub>2</sub> – 1,41 раза, CA<sub>3</sub> – 1,44 раза, порівняно з контролем. Подальша 1 год реперфузії характеризується деяким зниженням активності ферменту відносно 20 хв ішемії, однак показники продовжують залишатись вищими відносно контролю: CA<sub>1</sub> це – 1,32 раза, CA<sub>2</sub> – 1,25 раза, CA<sub>3</sub> – 1,2 раза. За умов 24 год реперфузії картина подібна в усіх полях гіпокампа. Отже, власне ішемія зумовлює зростання активності цього ферменту, яке триває подальші 1- та 24 год реперфузії.

Уведення L-аргініну без проведення ішемічно-

**Мета дослідження.** Встановити взаємозв'язок між активністю Г-6-ФДГ та продукуванням оксиду азоту гіпокампа шурів за умов ішемії-реперфузії головного мозку.

**Матеріал і методи.** Дослідження проводили в білих беспородних самцях шурів, масою 130–150 г, які знаходилися в умовах віварію на стандартному вигдовуванні. Експерименти проведені з дотримання Європейської конвенції по захисту хребетних тварин яких використовують в експериментах та інших наукових цілях (Страсбург, 1986). Дослідні тварини розподілені на 8 груп: 1-у групу склали контрольні тварини; 2-у – тварини, яким моделювали неповну глобальну ішемію мозку шляхом накладання затискачів в загальні сонні артерії на 20 хвилин; 3-ю – тварини, які після 20-хвилинної ішемії підлягали реперфузії на 24 години; 4-у – тварини, які після 20-хвилинної ішемії підлягали реперфузії на 24 години; 5-у – тварини, яким вводили амінокислоту L-аргінін (виробництва «Synex Pharma», Китай) внутрішньовенно, з розрахунку 150мг/кг; 6-у – тварини, які після введення L-аргініну підлягали 20-хвилинній ішемії; 7-у – тварини, яким вводили L-аргінін, піддавали 20-хвилинній ішемії з подальшою реперфузією 1 годину; 8-у – тварини, яким вводили L-аргінін, піддавали 20-хвилинній ішемії з подальшою реперфузією 24 години. Кожна група налічувала 10 тварин. Декапітацію проводили під ефірним наркозом. На холоді забирали головний мозок, виділяли та забирали поля гіпокампа (CA<sub>1</sub>, CA<sub>2</sub>, CA<sub>3</sub> згідно з атласом стереотаксичних координат мозку шурів [1]. Наважки зважували та гомогенізували. Активність Г-6-ФДГ визначали згідно методики [3], концентрацію нітритів та нітратів спектрофотометрично використанням реактива Грісса [5]. Статистичну обробку результатів проводили після створення баз даних у системі Microsoft Excel та за програмою «BioStat» з визначенням t-критерію Стьюдента.

**Результати та їх обговорення.** Результати дослідження представлені у таблиці.

реперфузійного втручання дещо підвищує активність Г-6-ФДГ у тканині гіпокампа, однак статистично достовірної різниці порівняно з контролем не спостерігається.

Уведення L-аргініну поєднане з 20 хв ішемією підвищує активність Г-6-ФДГ відносно контролю, однак дані показники мало відрізняються від тих, що отримані в 2-й дослідній групі. Активність Г-6-ФДГ достовірно зростає за умов введення L-аргініну за 1- та 24 год реперфузії. У цих дослідних групах отримані найбільш величини активності ферменту серед усіх груп. Відносно контролю L-аргінін - 1 год реперфузії складає під

лення у СА<sub>1</sub> в 1,82 раза, СА<sub>2</sub> – 1,61 раза, СА<sub>3</sub> – 1,71 за; L-аргінін – 24 год реперфузії: СА<sub>1</sub> – 1,88 раза, СА<sub>2</sub> 1,64 раза, СА<sub>3</sub> – 1,73 раза. Тобто, активність ферменту зростає практично на однаковому рівні.

Отже, власне ішемічно-реперфузійне втручання призводить до зростання активності Г-6-ФДГ в полях покампа, а за умов уведення L-аргінину активність її зсилюється під час реперфузії.

Гістохімічне вивчення активності досліджуваного ферменту за умов ішемії не протирічить нашим даним. Початку відмічається зростання Г-6-ФДГ в усьому покампі (4 год), яке триває до 6 год в СА<sub>1</sub>, однак у А<sub>3</sub> зменшується, порівняно з контролем. Автори ропонують, що нейрони поля СА<sub>1</sub> мають певний антиоксидантний арсенал, що дозволяє їм справлятися з кисним стресом у перші декілька годин [6].

Згідно отриманих даних, концентрація нітритів та нітратів (NO<sub>x</sub>) у полях гіпокампа під впливом 20 хв ішемії зростає відносно контролю у: СА<sub>1</sub> – в 1,5 раза, А<sub>2</sub> – 1,41 раза, СА<sub>3</sub> – 1,4 раза. Дещо зменшується зраз 1 год реперфузії, а за умов 24 год, знаходиться на якому рівні, що й у 2-й дослідній групі.

Уведення L-аргінину призводить до збільшення вня NO<sub>x</sub> у полі СА<sub>1</sub> в 1,19 раза, в інших полях досторної різниці з контролем немає. За 20 хв ішемії та зведення L-аргінину зростання NO<sub>x</sub> у полі СА<sub>1</sub> складає 71 раза, порівняно з контролем, СА<sub>2</sub> – 1,63 раза, СА<sub>3</sub> 1,6 раза. За умов 1 год реперфузії та уведення L-ргініну в СА<sub>1</sub> – 1,8 раза, СА<sub>2</sub> – 1,65 раза, СА<sub>3</sub> – 1,69 за. Значне підвищення рівня NO<sub>x</sub> спостерігається в

останній дослідній групі і складає у полі СА<sub>1</sub> 2,16 раза, СА<sub>2</sub> – 1,94 раза, СА<sub>3</sub> – 2,02 раза.

Отже, згідно наших даних, зростання активності Г-6-ФДГ корелює з підвищенням рівня нітратів та нітритів у тканині гіпокампа. Це підтверджує зв'язок між продукуванням NO та вуглеводневим обміном, через механізми за участю глюкозо-6-фосфатдегідрогенази. Враховуючи велику чутливість нервової тканини до нестачі глюкози, можна припустити, що саме через ці ендogenous механізми, мозок може збільшити можливості нейронів протистояти летальному ішемічному виклику.

**Висновки.** 1. Ішемічне втручання впродовж 20 хв зумовлює зростання активності Г-6-ФДГ та рівня нітратів і нітритів у полях гіпокампа.

2. Реперфузія впродовж 1- та 24 год характеризується підвищеними показниками Г-6-ФДГ та NO<sub>x</sub> відносно контролю, однак значення не перевищують показники після 20 хв ішемії.

3. Уведення L-аргінину посилює активність Г-6-ФДГ, особливо під час реперфузії, що корелює з підвищенням нітратів та нітритів.

4. Активність Г-6-ФДГ впливає на метаболізм оксиду азоту за умов ішемії-реперфузії головного мозку, що може відігравати певну роль.

**Перспективи подальших досліджень.** Доцільним є подальше розкриття механізмів взаємозв'язку, між вуглеводневим обміном, зокрема ферментом Г-6-ФДГ, та активністю NO-продукуючих систем за умов ішемічно-реперфузійного ушкодження мозку.

#### ЛІТЕРАТУРА:

Буданцев А.Ю. Стереотаксический атлас мозга крыс фронтальные сечения) / А.Ю.Буданцев. – Пушино: Аналитическая микроскопия. – 2002. – С. – 205.

Дмитренко Н.П. Аргинин: биологическое действие, влияние на синтез оксида азота / Н.П. Дмитренко, Т.О. Ишко, С.Г. Шандренко // Укр. хіміотерапевтичний ур. – 2008. – № 1-2(22). – С. 137–141.

Захарьин Ю.А. Метод определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и 6-фосфоглюконатгидрогеназы / Ю.А. Захарьин // Лаб. дело. – 1967. – № – С. 327–330.

Максимович Н.Е. Особенности формирования урочия оксида азота в плазме крови крыс при ишемических и перфузионных повреждениях головного мозга / Н.Е. Максимович // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 2004. – № 3. – С. 55–60.

Орлова Е.А. Анализ нитритов и нитратов в ткани при экспериментальной острой почечной недостаточности / Е.А. Орлова // Укр. Жур. екстремальної медицини і Г.О. Можасва. – 2002. – № 1. – С. 79 – 81.

Agarwal R. Redistribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase in response to cerebral ischemia in rat brain / R.

Agarwal, A. Rami // Indian journal of clinical biochemistry. – 2003. – № 2. – P. 64–70.

7. Glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression decreases endothelial cell oxidant stress and increases bioavailable nitric oxide / J.A. Leopold, Y.-Y. Zhang, A.W. Scribner [et al.] // Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology. – 2003. – v. 23. – P. 411–423.

8. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency decreases vascular superoxide and atherosclerotic lesions in apolipoprotein E –/– mice / R. Matsui, S. Xu, K.A. Maitland [et al.] // Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology. – 2006. – v. 26. – P. 910–916.

9. L-arginine infusion increases glucose clearance during prolonged exercise in humans / G.K. McConell, N.N. Huynh, R.S. Lee-Young [et al.] // AJP-Endocrinology and metabolism. – 2005. – № 3. – P. 273–284.

10. The involvement of glucose methabolism in the regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in glial cells: possible role of glucose-6-phosphate dehydrogenase and CCAAT/enhancing binding protein / J.-S. Won, Y.-B. Im, L. Key [et al.] // The journal of neuroscience. – 2003. – v. 23. – P. 7470–7478.

Куровська В.О., Ткачук С.С., Тимофійчук І.Р. Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази за умов ішемії-реперфузії: вплив по-залежних механізмів // Український медичний альманах. – 2009. – Том 12, № 6. - С. 114-115.

Неповна глобальна ішемія головного мозку в шурів тривалістю 20 хв викликає зростання активності Г-6-ФДГ і рівня нітратів і нітритів у гіпокампі. Подальша реперфузія 1- та 24 год також характеризується підвищеними показниками Г-6-ФДГ і NO<sub>x</sub> відносно контролю, але ці показники не вище, ніж за 20 хв ішемії. Уведення L-аргінину посилює активність Г-6-ФДГ, особливо під час реперфузії, що корелює з підвищенням рівня нітратів і нітритів.

**Ключові слова:** Г-6-ФДГ, гіпокамп, ішемія, реперфузія, оксид азоту.

Куровская В.О., Ткачук С.С., Тимофійчук И.Р. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в условиях ишемии-реперфузии: влияние по-зависимых механизмов // Украинский медицинский альманах. – 2009. – Том 12, № 6. - С. 114-115.

Неполная глобальная ишемия головного мозга у шуров длительностью 20 мин вызывает возрастание активности Г-6-ФДГ и уровня нитритов и нитратов в гиппокампе. Дальнейшая реперфузия 1- 24 ч также характеризуется повышенными показателями Г-6-ФДГ и NO<sub>x</sub> относительно контроля, но эти показатели не выше, чем при 20 мин ишемии. Введение L-аргинина усиливает активность Г-6-ФДГ, особенно во время реперфузии, что коррелирует с повышением уровня нитратов и нитритов.

**Ключевые слова:** Г-6-ФДГ, гиппокамп, ишемия, реперфузия, оксид азота.

Kurovs'ka V.O., Tkachuk S.S., Timofiihuk I.R. Activity of glucose-6-phosphatdehydrogenase under the conditions of ischemia-reperfusion: the effect of no-dependent mechanisms // Український медичний альманах. – 2009. – Том 12, № 6. - С. 114-115.

The incomplete global ischemia of a brain in rats duration 20 min causes increase of activity G-6-PDG and a level of nitrites and nitrates in hippocampus. The further reperfusion 1- 24 h also has increase parameters G-6- PDG and NO<sub>x</sub> concerning the control, but these parameters are not higher than at 20 min of an ischemia. Introduction of L-arginine strengthens activity G-6-PDG, is especial during time of reperfusion, that correlates with increase of a level of nitrates and nitrites.

**Key words:** G-6-PDG, hippocampus, ischemia, reperfusion, nitric oxide.

Надійшла 28.10.2009 р.  
Рецензент: проф. Н.К.Казімірко